

Aus dem Institut für Pharmakologie und Biochemie
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. med. E. Jenny)
Arbeit unter der Leitung von Dr. phil. II C.W. Heizmann

Isolierung und Charakterisierung eines Einstrang-DNS-bindenden 35 K Proteins aus Kalbshirnrinde

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
GIAN-CHRISTIAN WINKLER
Tierarzt
von Zürich und Basel

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. C. C. Kuenzle, Referent
Prof. Dr. E. Jenny, Korreferent

1981
aku-Fotodruck Zürich

Aus dem Institut für Pharmakologie und Biochemie
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. med. E. Jenny)
Arbeit unter der Leitung von Dr. phil. II C.W. Heizmann

Isolierung und Charakterisierung eines Einstrang-DNS-bindenden 35 K Proteins aus Kalbshirnrinde

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
GIAN-CHRISTIAN WINKLER
Tierarzt
von Zürich und Basel

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. C. C. Kuenzle, Referent
Prof. Dr. E. Jenny, Korreferent

1981

aku-Fotodruck Zürich



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1. 1. Das Chromatin : Zusammensetzung und Struktur	1
1. 2. Die Hauptkomponenten des Chromatins	2
1.2.1. Die Desoxyribonukleinsäure (DNS)	2
1.2.2. Histone	2
1.2.3. Nichthistone	3
2. PROBLEMSTELLUNG	7
3. MATERIAL	9
3. 1. Versuchstiere	9
3. 2. Chemikalien	9
3. 3. Isotopen	9
3. 4. Proteine	10
3. 5. Immunologische Reagenzien	10
3. 6. Pufferlösungen	11
3. 7. Apparate	11
4. METHODEN	12
4. 1. Cortexpräparation	12
4. 2. Herstellung der DNS-Zellulose	12
4. 3. Isolierung Einstrang-DNS-bindender Proteine	12
4. 4. Proteinbestimmung	14
4. 5. Aminosäurenanalyse	14
4. 6. Plattengelelektrophorese	14
4. 7. Zweidimensionale Hochauflösungsgelelektrophorese	15
4. 8. Bestimmung des nativen Molekulargewichtes	16
4. 9. DNS-Schmelzpunktbestimmung	16
4.10. Bestimmung der Destabilisierungs- bzw. Stabilisierungs- (Renaturierungs-) Eigenschaften des Proteins	16
4.11. Gewinnung eines Antiserums	17
4.12. Bestimmung des Antikörpertiters	18

	Seite
4.13. Bestimmung der Antikörperspezifität	18
4.14. Herstellung eines Immunosorbens mit Antikörpern gegen 35 K Protein	19
4.15. Isolierung des 35 K Proteins mittels Immunosorbens und Kontrolle der Eigenschaften des Proteins	20
4.16. 33 K Protein und UP 1 aus Kalbsthymus	21
5. RESULTATE UND DISKUSSION	22
5. 1. Isolierung des 35 K Proteins mittels DNS-Zellulose-Chromatographie	22
5. 2. Aminosäurezusammensetzung	23
5. 3. Molekulargewicht	25
5. 4. Gelelektrophoretisches Verhalten	28
5. 5. Beeinflussung des Schmelzpunktes von nativer DNS und Renaturierungseigenschaften	30
5. 6. Charakterisierung des Antiserums	31
5. 7. Isolierung und Reinigung des Proteins mittels Immunosorbens	34
6. SCHLUSSFOLGERUNGEN	37
7. ZUSAMMENFASSUNG	39
8. LITERATURVERZEICHNIS	41
9. DANKESADRESSEN	50
10. LEBENSLAUF	51

VERZEICHNIS DER ABKUERZUNGEN

DNS	Desoxyribonukleinsäure
RNS	Ribonukleinsäure
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
Poly (dA-dT) · poly (dA-dT)	3'-5' doppelsträngiges Kopolymer von Desoxyadenosinmonophosphat und Desoxythymidinmonophosphat in regelmässig abwechselnder Reihenfolge
cm	Zentimeter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
l	Liter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
M	Molar (Mol/Liter)
mM	Millimolar (Millimol/Liter)
Ci	Curie; Radioaktivitätsmass.: 1 Curie = $3.7 \cdot 10^{10}$ Bq, entspricht $3.7 \cdot 10^{10}$ Zerfällen pro s
mCi	Millicurie
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
g	Erdbeschleunigung (9.81 m s^{-2})
MG	Molekulargewicht (Molekülmasse)
D	Dalton (Masse eines Wasserstoffatoms)
K	Kilodalton
$A_{280}^{1\%}$	Absorptionskoeffizient; entspricht der Lichtabsorption einer Lösung von 1 g/100 ml bei einem Lichtweg von 1 cm und einer Wellenlänge von 280 nm
2-D	Zweidimensional
IgG	Immunglobulin G
IgA	Immunglobulin A
S ₁ -Nuklease	Endonuklease aus <i>Aspergillus oryzae</i>

IV

SDS	Natrium-Dodecylsulphat (sodium dodecyl sulfate)
EDTA	Aethylendiamintetraazetat
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
TBSE	Tris-gepufferte Salzlösung mit EDTA-Zusatz
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
DEAE	Diaethylaminoethyl-
DTT	Dithiothreitol
ABTS	2,2'-azino-di(3-ethyl-benz-thiazolin-6-sulphonat)
BSA	Rinderserumalbumin
UP	Helixdestabilisierendes Protein (unwinding protein)
PAGE	Polyakrylamidgelelektrophorese
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay

1. Einleitung

1.1. DAS CHROMATIN : ZUSAMMENSETZUNG UND STRUKTUR

Das Chromatin der Eukaryonten besteht aus folgenden drei Hauptkomponenten :

- DNS als Trägerin der Erbinformation
- Histone als Strukturproteine
- Nichthistone als Struktur- und Regulationsproteine (Bonner 1979).

Ferner werden zum Chromatin gezählt : Kern-RNS in etwa der gleichen Menge wie DNS (Bonner 1979), Lipide und Restproteine der Kernmembran, die stellenweise eng mit dem Chromatin verbunden ist. Verschiedene Enzyme wie die DNS Polymerasen u.a. werden je nach Autor separat aufgeführt oder den Nichthistonon zugeteilt (Bonner 1979).

Die räumliche lichtmikroskopische Struktur des Metaphasenchromatins ist das Chromosom. Es besteht aus Chromatinfibrillen von etwa 20-30 nm Durchmesser und 700-800 μ m Länge. Eine Fibrille enthält vermutlich einen DNS Doppelstrang, der von Proteinen umgeben ist.

Die Erforschung der Morphologie des Interphasenchromatins der Eukaryonten ist erst seit 1974 möglich, weil erst seit diesem Zeitpunkt die technischen Voraussetzungen für eine elektronenmikroskopische Darstellung bestehen (Bonner 1979). Das Modell, das Olins und Olins 1974 erstmals vorstellten, entspricht der räumlichen Struktur einer Perlschnurkette (beads on a string), zumindest bei niedriger Ionenstärke des umgebenden Mediums. Dabei ist der DNS-Faden (Doppelhelix) in regelmässigen Abständen jeweils zweimal um eine Histonekugel gewickelt. Die regelmässig sich wiederholende Chromatineinheit wird als Nukleosom bezeichnet (Übersicht in Kornberg 1977 und Felsenfeld 1978).

Nichthistonproteine umgeben die DNS im Bereich zwischen den Histonkugeln, die als Verbindungsstück-DNS (linker DNA) bezeichnet wird (Peters et al. 1979). Man findet sie aber auch in oder auf dem Nukleosom (Mardian et al. 1980, Weisbrod et al. 1980). Packungsdichte, Anordnung und eventuelle Bindung der Proteine mit der DNS sind in hohem Masse von der Ionenstärke der Umgebung abhängig (Duguet und de Recondo 1978, Felsenfeld 1978, Bonner 1979, Thoma et al. 1979).

1.2. DIE HAUPTKOMPONENTEN DES CHROMATINS

1.2.1. Die Desoxyribonukleinsäure (DNS)

Die DNS stellt die heute wohl am besten untersuchte Komponente des Chromatins dar. Zusammensetzung, Bau und Funktion sind vielerorts beschrieben (z.B. Hand 1978).

1.2.2. Histone

Weil man diese niedermolekularen, basischen Proteine lange Zeit schlecht trennen konnte, blieben sie bis 1964 wenig untersucht, obwohl sie schon 1871 von F. Miescher mit der DNS zusammen entdeckt worden waren (Bonner 1979). Heute unterscheidet man fünf Histonklassen (Ciba Symposium Nomenklatur : H 1, H 2a, H 2b, H 3, H 4). Diese werden in die Gruppe der lysinreichen (H 1), der weniger lysinreichen (H 2a, H 2b) und der argininreichen (H 3, H 4) Histone eingeteilt (Elgin und Weintraub 1975). Histone scheinen bei allen Eukaryonten vorzukommen, nicht aber bei Prokaryonten.

Von vielen Histonen kennt man die Aminosäuresequenz, also die Primärstruktur, welche im Vergleich mit Histonen verschiedener Tierarten zeigt, dass diese Proteine zu den konservativsten gehören, die man heute kennt. Die Histone verschiedener Gewebe innerhalb einer Tierart unterscheiden sich im allgemeinen nicht, d.h. die Gewebespezifität ist gering (Elgin und Weintraub 1975).

Wie bereits im Kapitel 1.1. beschrieben, dienen die Histone zusammen mit der DNS zur Bildung der räumlichen Perlschnurkettenstruktur. Als Nukleosom bezeichnet man die "Perlen" dieser Kette (Kornberg und Klug 1981). Ein Nukleosom besteht aus einem Histonoktamer, welches seinerseits aus vier Histonpaaren von H 2a, H 2b, H 3 und H 4 gebildet wird. Darum herum verläuft die Kern-DNS. H 1 ist dem Nukleosom zwar angegliedert, aber nicht in dieses inkorporiert. Es schliesst sich an der Austrittsstelle der Verbindungs-DNS eng ans Nukleosom an (Thoma et al. 1979).

1.2.3. Nichthistone

Der Begriff Nichthistone bezeichnet eine sehr heterogene Gruppe von mehreren hundert chromosomalen Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen. Erst in den letzten zehn Jahren wurde die Untersuchung einzelner Nichthistone in Angriff genommen. Generelle Aussagen sind kaum möglich, wenngleich man ganz allgemein sagen kann, dass viele der heute untersuchten Nichthistone wahrscheinlich regulatorische Funktionen im Chromatin ausüben. Es scheint aber auch Strukturproteine in dieser Gruppe zu geben. Nicht-histonproteine vergleichbarer Funktion haben oft spezies- und gewebespezifischen Bau. Ebenso scheint die quantitative Verteilung gewebespezifisch zu sein (Gordon et al. 1980).

Die heute am besten untersuchte Nichthistongruppe wird als HMG (high mobility group) bezeichnet, aufgrund ihrer elektrophoretischen Wanderungseigenschaften auf Polyakrylamidgelen. Es handelt sich vorwiegend um niedermolekulare Proteine, welche mit 0.35 M NaCl aus dem Chromatin extrahiert werden und in 2% Trichloressigsäure löslich sind. Eine analoge Gruppe (LMG = low mobility group) besteht aus höhermolekularen Proteinen, welche in 2% Trichloressigsäure präzipitieren (Goodwin et al. 1973).

Unter den HMG-Proteinen von Säugetieren unterscheidet man vier Hauptproteine (HMG 1, HMG 2, HMG 14 und HMG 17), die weitverbreitet sind. HMG 1 und 2 zeigen Mikroheterogenität auf 2-D Gelen, d.h. sie bestehen aus Proteinen von jeweils gleichem

Molekulargewicht, aber verschiedenen isoelektrischen Punkten (Walker et al. 1976). Es handelt sich dabei um eine posttranslationalen Modifikation durch Azetylierung und Methylierung (Sterner et al. 1979, Boffa et al. 1979). Ein Einfluss auf die DNS-Bindungsaktivität der Proteine durch diese Modifikation wird vermutet.

HMG-Proteine wurden im Kalbsthymus (Goodwin et al. 1973), in Kalbsleber (Goodwin et al. 1980), Kalbsmilz und Nieren (Rabbani et al. 1978) gefunden, aber auch in Geweben von Kaninchen, Ratte, Schwein, Schaf und Maus (Goodwin et al. 1978 und Romani et al. 1979). Neben den vier Hauptproteinen kommen in Säugetiergeweben noch weitere HMG-Proteine in kleineren Quantitäten vor (Goodwin et al. 1980).

Auch aus Geweben anderer Eukaryonten wurden HMG-Proteine isoliert mit teilweise tierklassenspezifischen Eigenschaften. In Hühnererythrozyten (Walker und Johns 1980), Testes und Leber von Forellen (Wigle und Dixon 1971, Marushige und Dixon 1971, Watson et al. 1977 und Rabbani et al. 1980), *Drosophila* (Alfageme et al. 1976) und *Tetrahymena* (Hamana und Iwai 1979) wurden diese Proteine gefunden. Von vielen sind Aminosäurezusammensetzung oder Primärstruktur bekannt. Auffallend ist der hohe Anteil an Aminosäureresten mit positiver und/oder negativer Ladung. Der Sequenzvergleich homologer Proteine in Geweben von Kalb, Huhn und Forelle zeigt eine erstaunliche Evolutionsstabilität (Walker und Johns 1980, Walker et al. 1980).

Dagegen scheint die Gewebespezifität weniger ausgeprägt zu sein (Rabbani et al. 1978), denn, wie Untersuchungen von Romani et al. (1979) zeigten, ist HMG 1 in Mäuselebern, Kalbsthymus und Erythrozyten immunologisch sehr ähnlich.

HMG 1 und 2 haben die Eigenschaft, Histone und DNS zu binden und native DNS zu destabilisieren (Shooter et al. 1974, Goodwin et al. 1975, Isackson et al. 1979 und Javaherian et al. 1979). Im Chromatin binden sie sich vorwiegend im Bereich zwischen den Nukleosomen an die DNS (Teng et al. 1979), dagegen wurden die

Bindungsstellen für HMG 14 und 17 am Nukleosom selbst lokalisiert (Goodwin et al. 1977, Weisbrod et al. 1980).

Hinweise auf eine Bedeutung der HMG-Proteine bei der Genexpression brachten Versuche von Levy et al. (1977), Vidali et al. (1977), Goodwin et al. (1979) und Weisbrod et al. (1980). Die Empfindlichkeit der DNS für den Abbau durch DNase I oder Mikrokokken-Nuklease steigt nämlich nach Zugabe von HMG-Proteinen. Die beiden Enzyme sind dafür bekannt, dass sie unter kontrollierten Bedingungen vorwiegend diejenigen Abschnitte der DNS abbauen, die aktiv transkribierte Gene enthalten. Weitere Anzeichen für eine regulatorische Funktion der Proteine sind die quantitativ (Gordon et al. 1980) und qualitativ gewebespezifische Verteilung. So findet im Hoden kryptorchider Ratten eine HMG 2 Abnahme statt, während H 1⁰, ein Histon nicht-proliferierender Zellen, mengenmässig zunimmt (Seyedin und Kistler 1979).

Obwohl viele biochemische und immunologische Eigenschaften dieser Proteine bestimmt worden sind, ist doch nichts Sicheres über ihre Funktion bekannt. Einerseits deuten das mengenmässige Auftreten (10⁶ Moleküle pro Kern laut Rabbani et al. 1978) und die konservative Erhaltung der Aminosäuresequenz während der Evolution auf Strukturfunktionen, andererseits geben die Zusammenhänge mit aktiv transkribierten Gensequenzen Anlass zur Vermutung, die Proteine könnten regulatorische Funktionen ausüben.

Besonders interessant sind auch Versuche von Bustin und Neihard (1979), die immunologisch HMG 1-Protein in grossen Mengen im Zytoplasma von Rattenleberzellen nachwiesen.

Neben dieser gut charakterisierten Gruppe der HMG-Nichthistone gibt es eine weitere, die ebenfalls aufgrund von Isolierungskriterien eine Reihe von Proteinen zusammenfasst. Es handelt sich um DNS-bindende Nichthistone. Da es auch DNS-bindende HMG-Proteine gibt, überschneiden sich diese Gruppen. Die Bindung erfolgt je nach Protein nur an native DNS, nur an einsträngige oder aber an beide Arten. Eine Uebersicht über diese Proteine findet sich bei Coleman und Oakley (1980) und Falaschi et al.

(1980). Einige dieser Proteine können native DNS destabilisieren (Herrick und Alberts 1976b), andere renaturieren Einstrang-DNS wieder zu Doppelsträngen (Mather und Hotta 1977). Wieder andere bilden stabile Protein-DNS-Komplexe und schirmen dadurch die DNS z.B. von Antikörpern oder Polymerasen ab (Neubort et al. 1979 und Herrick et al. 1976). Ein Protein aus *Drosophila* (Weideli et al. 1980) bindet sich bevorzugt an spezifische Gensequenzen von *Drosophila*-DNS. Es gibt Beispiele für DNS-bindende Proteine, die DNS-Polymerasen stimulieren oder inhibieren (Herrick et al. 1976, Riva et al. 1980).

Auch bei dieser Gruppe von Proteinen gibt es zahlreiche Hinweise auf eine Bedeutung bei der Genexpression, wie auch bei Replikation und Reparatur der DNS (Crepin und Dastugue 1979, Dastugue und Crepin 1979, Moranelli und Liebermann 1980, Reinhard und Müller 1980, Meyer et al. 1979).

DNS-bindende Proteine finden sich in pflanzlichen und tierischen Zellen, in Prokaryonten wie auch in Eukaryonten und ebenso in Viren und Phagen. Lokalisiert sind sie im allgemeinen im Chromatin, es wurden aber auch grössere Quantitäten im Zytoplasma von Zellen nachgewiesen (Catino et al. 1979). Das Vorkommen von DNS-bindenden Proteinen (auch HMG 1) im Zytoplasma lässt sich nicht allein mit der Translation, d.h. Produktion der Proteine in diesem Kompartiment erklären.

2. Problemstellung

Unter den Nichthistonproteinen im Gehirn von Ratten gibt es mehrere, die offenbar erst postnatal auftreten (Heizmann et al. 1980a). Eines davon, welches der LMG-Gruppe zuzuordnen ist, zeigt ein Molekulargewicht von 35 000 auf SDS-Gelen. Es erregte unser Interesse besonders wegen seiner Einstrang-DNS-bindenden Eigenschaften.

Aufgabe dieser Arbeit war es, ein homologes Protein aus der Grosshirnrinde des Kalbes zu isolieren. Die Reinigung dieses Proteins, die biochemische Charakterisierung und die Bestimmung der Funktion waren Ziel dieser Untersuchung. Ein Vergleich mit homologen Proteinen aus Rattenhirnrinde und Kalbsthymus (Herrick und Alberts 1976a) sollte des weiteren Aufschluss geben über allfällige Spezies- und Gewebespezifität.

Das Auftreten dieses Proteins in Neuronen der Grosshirnrinde der Ratte kurz nach der Geburt ist in folgendem Zusammenhang zu betrachten : Die Teilungsfähigkeit der prospektiven Neuronen der Grosshirnrinde der Ratte geht zur Zeit der Geburt verloren. Wanderung und Ausbildung der definitiven Zytoarchitektonik dauern aber in den oberflächlichen Schichten bis zum 10. Tag nach der Geburt an, die weiteren Reifungsprozesse sogar noch länger (Jacobson 1978).

Im Zeitraum kurz nach der Geburt wurde aufgrund verschiedener, vor allem zytochemischer Methoden ein DNS-Anstieg über das diploide Mass hinaus in Grosshirnrindenneuronen festgestellt und parallel dazu auch ein Anstieg der Histone (Bregnard et al. 1975, Bregnard et al. 1977, Kuenzle et al. 1978 und Bregnard et al. 1979). In derselben Zeit scheint eine Verkürzung der Replikationslänge des Chromatins (das ist der Abstand der einzelnen Nukleosomen) in den Neuronen stattzufinden (Ermini und Kuenzle 1978, Brown 1978).

Schliesslich sind im Nichthistonproteinmuster dieser Zellen die bereits erwähnten qualitativen Aenderungen festgestellt worden (Heizmann et al. 1980a).

Durch die Untersuchung eines Nesthockers (Ratte) und eines Nestflüchters (Meerschweinchen, Studer et al. 1981) konnte die Annahme bestätigt werden, dass die genannten Vorgänge mit dem Verlust der Mitosefähigkeit zeitlich korrelieren. Nur bei der Ratte fällt der Proliferationsstop dieser Zellen mit der Geburt zusammen, beim Meerschweinchen fällt er in die Mitte der Trächtigkeit und auch die übrigen Chromatinveränderungen finden zu dieser Zeit statt. Ungewiss bleibt aber, ob die obigen Vorgänge im Sinne von Ursache und Wirkung in Zusammenhang stehen.

3. Material

3.1. VERSUCHSTIERE

Ganze Kalbsgehirne wurden direkt vom Schlachthof Zürich bezogen. SIV-50 Ratten beiderlei Geschlechts im Alter von 20 Tagen stammten aus dem Institut für Zuchthygiene der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich. Zur Immunisierung wurden 2 etwa 6 Monate alte Neuseeländerkaninchen aus institutseigener Zucht verwendet.

3.2. CHEMIKALIEN

Kalbsthymus-DNS (Worthington); Poly(dA-dT)·poly(dA-dT) (P-L Biochemicals); Agarose und Pepstatin (Sigma); CF 11 Zellulose, ungewaschen und DE 52 Ionentauscher (Whatman); Sephadex G 200, G 100, G 25, CNBr aktivierte Sepharose 4B, Natrium-Dextransulphat und Dextranblau (Pharmacia); Polyäthylenglykol PEG 6000 (Merck); Ampholine pH 3-10 und 5-7 (LKB); N,N,N',N'-Tetramethyl-äthylendiamin und N,N'-Methylenbisakrylamid (Eastman-Kodak); 2,2'-azino-di (3-äthylbenzthiazolin-6-sulphonat) = ABTS (Boehringer); Szintillationsflüssigkeit Ria Luma (Lumac, Basel); Harnstoff, ultrarein (Schwarz/Mann); Nonidet P 40 (Shell). Alle übrigen Chemikalien waren Handelspräparate von analytischem Reinheitsgrad.

3.3. ISOTOPEN

[¹⁴C]-Formaldehyd, 1% wässrige Lösung, 40-60 mCi/mMol (New England Nuclear).

3.4. PROTEINE

S₁ Nuklease (P-L Biochemicals). Zur Bestimmung der relativen Mobilität auf SDS-Gelen wurden folgende Markerproteine verwendet :

	Molekulargewichte (Untereinheit)
Phosphorylase <u>b</u>	94 000
Rinderserumalbumin	68 000
Ovalbumin	45 000
Kreatinkinase	40 000
Carboanhydrase	30 000
Sojabohnentrypsininhibitor	20 500
Lysozym	14 000

Kreatinkinase von Sigma, die anderen Proteine als Markergemisch von Bio Rad.

Folgende Proteine wurden zur säulenchromatographischen Bestimmung des Nativmolekulargewichtes verwendet:

	Molekulargewichte (nativ)
Katalase	240 000
Aldolase (Kaninchen)	152 000
MM-Kreatinkinase (Dimer)	85 000
Rinderserumalbumin	68 000
Ovalbumin	45 000

Kreatinkinase von Sigma, alle anderen Proteine von Serva.

3.5. IMMUNOLOGISCHE REAGENZIEN

Freund's komplettes und inkomplettes Adjuvans stammten von Difco, Anti-Kaninchen IgG-Peroxidase-Konjugat aus Ziegen von Nordic (Tilburg, Niederlande).

3.6. PUFFERLOESUNGEN

Puffer A	20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF, 10^{-6} M Pepstatin, 5 Vol% Glyzerin, 1 mM DTT
Puffer B	20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM NaCl, 5 Vol% Glyzerin
PBS	15 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4), 0,15 M NaCl, 0,01 % (Gew/Vol) NaN_3
S_1 -Nuklease in Puffer	0,05 M Natriumacetatpuffer (pH 5), 0,05 M NaCl, 1 mM ZnCl_2 , 0,7 Einheiten S_1 -Nuklease/ml
TBSE	0,05 M Tris-HCl (pH 7,4), 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % (Gew/Vol) BSA, 0,05 Vol% Tween 20
Waschlösung	0,15 M NaCl, 0,05 Vol% Tween 20
Zitratpuffer	0,1 M tri-Natriumzitrat (pH 4, mit Orthophosphorsäure)
Puffer für DNS-Schmelzversuche	10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4), 33 mM Kaliumchlorid, 0,3 mM Na_2EDTA , 1 mM 2-Mercapto-äthanol, 10 Vol% Glyzerin.

3.7. APPARATE

Folgende Apparate wurden verwendet:

- Kühlzentrifuge Sorvall RC 2-B
- Spektrophotometer Beckman Acta C III
- Spektrophotometer Gilford 2400 mit heizbaren Küvetten
- Szintillationsmessgerät Packard Tri Carb 3380
- Spannungs- und Stromspegelgerät Buchler 3-1014 A.

4. Methoden

4.1. CORTEXPRAEPARATION

Kalbsgehirne wurden unmittelbar nach der Schlachtung entnommen, auf Eis gelegt, Stamm und Kleinhirn entfernt und so rasch wie möglich bei -20°C tiefgefroren. Die Präparation erfolgte bei Raumtemperatur. Sobald die Rindenbezirke des Grosshirns auftauten, wurden sie stückweise mit einem scharfen Löffel herausgeschält.

4.2. HERSTELLUNG DER DNS-ZELLULOSE

In Anlehnung an die Methode von Alberts und Herrick (1971) und Herrick und Alberts (1976a) wurde Kalbsthymus-DNS in nativer oder hitzedenaturierter Form durch Antrocknen nichtkovalent an Zellulose adsorbiert.

4.3. ISOLIERUNG EINSTRANG-DNS-BINDENDER PROTEINE

Die ursprüngliche Methode von Herrick und Alberts (1976a) wurde durch einige Modifikationen unseren Bedürfnissen angepasst. Die ganze Isolierung erfolgte im Kühlraum bei 4°C . Von allen Zwischenstufen wurde das Volumen gemessen und eine Probe zur Proteinbestimmung entnommen.

Grob zerkleinerte Grosshirnrinde von jeweils 4 Kalbsgehirnen (ca. 600 g) wurde mit 1100 ml Puffer A versetzt, mit einem handelsüblichen Küchenmixer homogenisiert (3 x 30 s) und daraufhin bei $13\,000 \times g$ 30 Minuten in einem Sorvall GSA Rotor zentrifugiert. Nach Filtration des Ueberstandes durch ein Kästuch wurde unter ständigem Rühren NaCl bis zu einer Endkonzentration

von 2 M zugegeben. Nach Zusatz von 10 Gewichtsprozenten Polyäthylenglykol erfolgte wiederum eine Zentrifugation im GSA Rotor mit $13\,000 \times g$ für 30 Minuten. Der Ueberstand wurde nach Filtration durch Glaswolle gegen 3×20 l Puffer A ohne Glycerin dialysiert. Regelmässiges Wenden der Dialysesäcke sicherte die Durchmischung des Inhalts. Die Endkonzentration (10 Vol%) des Glycerins in der Lösung wurde durch Zugabe von 87 volumenprozentigem Glycerin erreicht. Eine weitere Zentrifugation im GSA Rotor bei $13\,000 \times g$ für 30 Minuten und nachfolgende Filtration durch Glaswolle führten zur klaren Lösung, die direkt zur Affinitätschromatographie verwendet wurde.

Native Kalbsthymus-DNS-Zellulose wurde in eine Säule von 5×7 cm, hitzedenaturierte in eine solche von 5×13.5 cm gepackt. Um sicherzugehen, dass sich auf der Nativ-DNS-Zellulose-Säule keine Einstrang-DNS befand, wurde die Säule bei Zimmertemperatur einige Stunden mit S_1 Nuklease in Puffer gewaschen (Isackson et al. 1979). Danach wurde sie gründlich mit Puffer A äquilibriert. Die Kontrolle der Äquilibrierung erfolgte durch Leitfähigkeitsmessung des Eluats im Vergleich zum Puffer A.

Zur Affinitätschromatographie wurde die Nativ-DNS-Zellulose-Säule der Einstrang-DNS-Zellulose-Säule vorgeschaltet, so dass der Durchbruch der ersteren zur Beschickung der zweiten Säule diente (Sequentialchromatographie). Die Zuleitung zur ersten Säule erfolgte aus einem Vorratsgefäss; das Eluat der zweiten Säule wurde durch ein Transmissions-Säulendurchfluss-Photometer über einen Einkanalschreiber überwacht. Nach beendeter Säulenbeschickung wurde mit Puffer A nachgewaschen bis der Durchbruch proteinfrei war. Die Säulen wurden entkoppelt und die Einstrang-DNS-Zellulose-Säule einer Waschung mit Natrium-Dextranulphat in Puffer A (0,50 mg/ml) unterzogen, wiederum bis zum proteinfreien Säulendurchbruch. Die Fraktionierung der auf der Einstrang-DNS-Zellulose-Säule zurückgehaltenen Proteine erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten in Puffer A (300 ml Puffer A + 300 ml 2 M NaCl in Puffer A). Die Proteinzusammensetzung der einzelnen Fraktionen wurde durch PAGE auf 12% Gelen

vorgenommen; entsprechende Fraktionen wurden vereinigt, gegen Puffer A dialysiert und durch Molekularfiltration oder Vakuumdialyse eingeengt.

Die weitere Reinigung des so gewonnenen 35 K Proteins erfolgte mittels einer zweiten Einstrang-DNS-Zellulose-Säule (1 x 26 cm). Wiederum wurden zwei Waschungen durchgeführt mit Puffer A bzw. Natriumdextransulphat in Puffer A. Ein NaCl-Gradient (je 50 ml 0,05 M und 2 M NaCl in Puffer A) diente als Elutionsmittel. Proteinhaltige Fraktionen wurden auf PAGE-Platten kontrolliert, auf eine Endkonzentration von 20 Vol% Glyzerin gebracht und bei -20°C eingefroren.

4.4. PROTEINBESTIMMUNG

Die Proteinkonzentration während der Isolierung wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Als Standard diente Rinderserumalbumin. Gereinigtes 35 K Protein wurde auch aufgrund seiner Absorption bei 280 nm gemessen, wobei der Umrechnungskoeffizient aus der Aminosäurenanalyse errechnet wurde ($A_{280}^{1\%} = 11.6$).

4.5. AMINOSÄURENANALYSE

Das Biochemische Institut der Universität Zürich bestimmte die Aminosäurezusammensetzung des gereinigten Proteins. Das Protein wurde 22 Stunden bei 110°C in 6 M HCl unter vermindertem Druck hydrolysiert. Die Bestimmung der Aminosäuren erfolgte mit einem Aminosäurenanalysator Durrum D-500.

4.6. PLATTENGELELEKTROPHORESE

Nach der Methode von Laemmli (1970) wurden 12 gewichtsprozentige, 1,5 mm dicke Akrylamidplatten hergestellt (10 x 14,5 cm). Die

Elektrophorese erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von SDS. Die relative Wanderungsgeschwindigkeit des gereinigten 35 K Proteins wurde durch Vergleich mit den mitgeführten Markerproteinen bestimmt.

4.7. ZWEIDIMENSIONALE HOCHAUFLOESUNGSGELELEKTROPHORESE

Die Elektrophorese wurde nach der Methode von O'Farrell (1975) durchgeführt. Unter Zusatz von Ampholinen (2% Konzentration, pH Bereich 3 - 10) wurden Rundgele hergestellt, deren pH-Gradient im Bereich von pH 5 - 8 linear verlief. In diesen Gradienten wurden die Proteinproben bis zum Stillstand isoelektrisch fokussiert. Danach wurden die Rundgele der ersten Dimension mit 25 mM Tris-Base, 192 mM Glyzin, 0,1 % (Gew/Vol) Natrium-Dodecylsulphat zweimal 5 Minuten äquilibriert. Der nächste Schritt umfasste die Uebertragung der Rundgele auf bereitgestellte, 12% PAGE Platten von 1,5 mm Dicke. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung aufgrund des Molekulargewichtes wurden die Proteine mit Coomassieblau angefärbt.

Eine im Vergleich zur Anfärbung grössere Empfindlichkeit wurde erreicht, indem die Proteinproben radioaktiv markiert wurden. Dies erfolgte durch reduktive [^{14}C]-Methylierung (Jentoft und Dearborn 1979). Eine Proteinprobe von etwa 200 μg (0,6 mg/ml in Puffer A) wurde mit 10-fach konzentrierter Stammlösung auf 20 mM NaCNBH_3 gebracht und mit 22 mM [^{14}C]-Formaldehydlösung versetzt bis auf eine Endkonzentration von 2 mM. Das Reaktionsgemisch wurde bei Zimmertemperatur 2 Stunden stehen gelassen, auf 9,5 M Harnstoff, 2 Gewichtsprozent Nonidet P-40, 2 Gewichtsprozent Ampholine pH 3 - 10 und 0,15 M Tris-HCl pH 8,8 gebracht. Diese Proteinprobe wurde direkt auf das Rundgel gegeben. Vom Platten-gel wurden Fluorographien nach Bonner und Laskey (1974) bzw. Laskey und Mills (1975) angefertigt.

4.8. BESTIMMUNG DES NATIVEN MOLEKULARGEWICHTES

Das Nativ-Molekulargewicht des gereinigten Proteins wurde nach der Methode von Andrews (1964 und 1965) auf einer Sephadex G 200 Säule (1 x 40 cm) bestimmt. Die Aequilibrierung erfolgte wiederum mit Puffer A.

Die Verwendung sehr kleiner Proteinmengen (50 - 100 µg) wurde durch die Verwendung [^{14}C]-markierter Proteine ermöglicht. Die Markierung erfolgte wie unter 4.7. Mit Dextranblau erfolgte die Bestimmung des Säulenvolumens. Fraktionen zu 200 µl wurden gesammelt, mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und die radioaktiven Zerfälle im Szintillationsmessgerät gezählt.

4.9. DNS SCHMELZPUNKTBESTIMMUNG

Die Schmelzpunktmessung erfolgte nach der Methode von Alberts et al. (1972). In den heizbaren Küvetten eines Gilford 2400 Spektrophotometers wurden 12 µg DNS in 300 µl Puffer untersucht. Die Messungen wurden mit und ohne Zugabe der 15-fachen Menge 35 K Protein durchgeführt. Unter kontinuierlichem Anstieg der Temperatur (1°C/min) wurden Temperatur, Zeit und Absorption bei 260 nm über einen Mehrkanalschreiber registriert.

4.10. BESTIMMUNG DER DESTABILISIERUNGS- BZW. STABILISIERUNGS- (RENATURIERUNGS-) EIGENSCHAFTEN DES PROTEINS

In einer Zweikammer-Mischküvette, deren Kammern im Lichtstrahl des Photometers hintereinander zu liegen kommen, wurde in die vordere Kammer native DNS (poly(dA-dT)·poly(dA-dT) bzw. Kalbsthymus DNS) gegeben (20 µg in 1 ml Puffer B), in die hintere Kammer füllte man 35 K Protein (300 µg in 1 ml Puffer B). In der Referenzküvette befand sich in beiden Kammern Puffer B. Die mit dieser Anordnung gemessene Absorption bei 260 nm galt als

Grundwert. Durch Mischen der verschlossenen Küvetteninhalte erhielten die DNS und das zu prüfende Protein Kontakt miteinander. Die Absorption bei 260 nm wurde gegen die Zeit aufgezeichnet. Der ganze Versuch wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt.

Analog zur obigen Untersuchung wurde auch diejenige auf Renaturierungseigenschaften des Proteins durchgeführt. 20 µg einsträngige Kalbsthymus-DNS (10 Minuten bei 100°C hitzedenaturiert und sofort im Eisbad abgekühlt) und die 15-fache Menge 35 K Protein wurden gemischt und die Absorption bei 260 nm aufgezeichnet.

4.11. GEWINNUNG EINES ANTISERUMS

Die Immunisierung der beiden 6 Monate alten Neuseeländerkaninchen wurde auf folgende Weise durchgeführt :

Am Tag 1 wurden je 20 ml Blut entnommen (Ohrvene), das zur Gewinnung von Kontrollserum diente.

400 µg Protein (0,1 mg/ml) wurden mit dem gleichen Volumen Freund's komplettem Adjuvans emulgiert und an ca. 60 Stellen intracutan in den Rücken jedes Tieres injiziert. Drei Wochen später erfolgte eine Nachimpfung mit gleichem Vorgehen allerdings mit nur je 250 µg Protein. Weitere 3 Wochen später wurden die Kaninchen mit je 200 µg Protein und Freund's inkomplettem Adjuvans nachgeimpft und zwar subcutan auf etwa 4 Stellen verteilt.

Die Blutentnahme erfolgte 10 Tage später durch Dekapitation. Das gesammelte Blut wurde über Nacht bei 4°C stehen gelassen, das Koagulat am anderen Morgen entfernt. Nach Zentrifugation im HB-4 Rotor (10 Minuten bei 1000 x g) war das überstehende Serum hell und klar. Es wurde nach Zugabe von 0,01 % (Gew/Vol) NaN₃ bei -20°C eingefroren.

4.12. BESTIMMUNG DES ANTIKOERPERTITERS

Zu Beginn der Immunisierung und regelmässig während derselben erfolgte die Bestimmung des Antikörpertiters mittels ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay; Catt und Tregear 1967; Engvall und Perlmann 1971; Engvall et al. 1971; Engvall und Perlmann 1972; Fey 1978).

In Polystyrolröhrchen (12 x 55 mm) wurde das Antigen (35 K Protein, 0,1 µg/ml in Puffer A, 0,5 ml pro Röhrchen) eingefüllt und eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Es folgte zweimaliges Waschen mit je 1 ml Waschlösung. Mit TBSE hergestellte Serumverdünnungen (0,5 ml) wurden nun in die Röhrchen gefüllt und diese für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde der oben beschriebene Waschvorgang zweimal wiederholt. Nach Zugabe von 0,5 ml Anti-Kaninchen IgG-Peroxidase-Konjugat in der Verdünnung 1:1000 wurden die Röhrchen für eine Stunde in den Wärmeschrank bei 37°C gestellt. Dreimaliges Waschen folgte in der beschriebenen Weise, bevor das Substrat zugegeben wurde (0,5 ml, 0,1 M Na-Zitrat pH 4, 2,5 mM ABTS, 0,08 Promille H₂O₂; Saunders und Bartlett 1977). Die Reaktion wurde nach 15 Minuten durch Zugabe von 0,5 ml 0,1 M HF in allen Röhrchen gestoppt und die Absorption bei 414 nm gemessen. Als Referenz diente Substratlösung mit HF.

Die Durchführung des Tests mit verschiedenen Verdünnungen der Kontrollseren führte zu einem Mittelwert der Absorption bei 414nm mit entsprechender Streuung s. Es wurde nun angenommen, die Reaktion von Kontrollseren mit dem Antigen sei negativ und der erhaltene Durchschnitt $\bar{x}$ sei demzufolge null. Als positive Serumreaktionen wurden alle diejenigen bezeichnet, deren Absorptionsmittelwerte grösser als $\bar{x} + 2 s$ waren (Fey 1978).

4.13. BESTIMMUNG DER ANTIKOERPERSPEZIFITÄET

Der Doppelimmundiffusionstest wurde gemäss Ouchterlony (1967) durchgeführt. Auf 0,8 % (Gew/Vol) Agarplatten diffundierte Antiserum gegen Gesamtextrakte aus Kalbshirnrinde,

Rattenhirnrinde, Rattenleber und gereinigtes 35 K Protein. Für eine verfeinerte Analyse der Spezifität wurde die Immunreplikatechnik angewendet (Showe et al. 1976). Dabei wurden die zur Untersuchung vorgesehenen Gesamtextrakte oder einzelne Proteine auf 12% Plattengelen mittels PAGE wie unter 4.6. aufgetrennt. Ueber dieses (ungefärbte) Gel wurde nun eine Mischung von 1 Volumen Antiserum und 2 Volumen Agarose in Wasser gegossen, wobei die Agarose eine Endkonzentration von 0,6 Gewichtsprozenten erreichte. Nachdem die Immunagarose erstarrt war, wurden Gel und Replikat in einer Feuchthaltekammer bei 37°C so lange inkubiert, bis deutliche Präzipitationsbanden im Replikat sichtbar wurden (im allgemeinen etwa nach 2 - 3 Stunden). Danach wurden beide Gele zusammen in PBS transferiert, wo sie sich nach ungefähr 10 Minuten wieder voneinander lösen liessen. Der Waschvorgang in PBS wurde über 3 Tage durchgeführt (tägliches Wechseln der ca. 500 ml Waschlösung), bis die nicht präzipitierten Proteine in der Agarose ausgewaschen waren. Nach einer einstündigen Passage in destilliertem Wasser wurde das Replikat mit Coomassieblau angefärbt.

4.14. HERSTELLUNG EINES IMMUNOSORBENS MIT ANTIKOERPERN GEGEN 35 K PROTEIN

20 ml des Antiserums von Kaninchen 2 wurden mit gleichem Volumen PBS verdünnt und mit 3,7 M Ammoniumsulfatlösung bei 4°C versetzt. Diese Mischung wurde über Nacht stehengelassen und am Morgen im HB-4 Rotor der Sorvall-Kühlzentrifuge mit 13 000 x g für 20 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde in 3 ml PBS aufgenommen und gegen 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 dialysiert. Es folgte eine Passage über eine DEAE-Zellulose-Säule (1 x 15 cm), die mit demselben Puffer äquilibriert worden war. Proteinhaltige Fraktionen des Durchbruchs wurden vereinigt und auf einer Sephadex G 200 Säule (1,5 x 60 cm) nach Molekulargewicht chromatographiert. In der Hauptfraktion wurden die IgG eluiert.

70 mg der IgG Fraktion wurden gemäss Angaben des Herstellers (Pharmacia) kovalent an 5 g CNBr aktivierte Sepharose gebunden. In einer Säule (1,5 x 15 cm) wurde das erhaltene Immunosorbens (18 ml) mit Puffer B äquiliibriert.

4.15. ISOLIERUNG DES 35 K PROTEINS MITTELS IMMUNOSORBENS UND KONTROLLE DER EIGENSCHAFTEN DES PROTEINS

Die Präparation der Kalbscortices erfolgte wie in 4.1. Das Material von jeweils 2 Kalbsgehirnen wurde mit ca. 500 ml Puffer B im Küchenmixer 5 x 30 Sekunden homogenisiert. Der Ueberstand nach Zentrifugation bei 13 000 x g für 30 Minuten im Sorvall GSA Rotor wurde abermals zentrifugiert und zwar im SS-34 Rotor bei 26 000 x g für 30 Minuten.

Dem so erhaltenen Ueberstand wurde das gegen das 35 K Protein gerichtete Immunosorbens (siehe 4.14.) zugegeben und das ganze im Becherglas für 3 Stunden mit einem Glasstab gerührt. Der ganze Vorgang erfolgte bei 4°C. Die nunmehr aus 35 K Protein, Antikörper und kovalent gebundener Sepharose bestehenden Komplexe wurden von der Proteinlösung folgendermassen abgetrennt : Das Gemisch wurde in eine Nutsche mit Glasfritte G 4 gegeben und abgesaugt. Der Rückstand wurde mit Puffer B resuspendiert, in eine Säule (1,5 x 15 cm) gegeben und mit demselben Puffer so lange nachgewaschen, bis der Durchbruch proteinfrei war. Die Elution der Proteine vom Immunosorbens erfolgte mit 0,15 M NaCl, dessen pH mit NH₃ auf 11 eingestellt worden war. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und sofort gegen Puffer B dialysiert (dreimal 2 Liter, 48 Stunden).

Das Eluat wurde dann auf eine Einstrang-DNS-Zellulose-Säule (1 x 26 cm, vorher äquiliibriert mit Puffer B) gegeben. Nach Waschen mit Puffer B bis zum proteinfreien Durchbruch erfolgte die Elution der verbliebenen Proteine mit 2 M NaCl in Puffer B. Nach Dialyse gegen Puffer B/20 Vol% Glyzerin wurden die Proteine bei -20°C eingefroren.

4.16. 33 K PROTEIN UND UP 1 AUS KALBSTHYMUS

33 K Protein und UP 1 (MG 24 000) wurden durch Dr. C.W.Heizmann nach Alberts und Herrick (1976a) isoliert und für vergleichende Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

5. Resultate und Diskussion

5.1. ISOLIERUNG DES 35 K PROTEINS MITTELS DNS-ZELLULOSE-CHROMATOGRAPHIE

Die Eigenschaft des 35 K Proteins, Einstrang-DNS, nicht aber native Kalbsthymus-DNS zu binden, wurde als Isolierungskriterium benützt (Abb. 1 und 2, Tab. 1). Wie sich zeigte, besass ein zweites Protein von MG 38 000 ebenfalls diese Eigenschaft. Durch die Waschung mit Natrium-Dextransulphat (0,5 mg/ml) konnte ein Grossteil dieses Proteins von der Säule entfernt werden, während das 35 K Protein zurückgehalten wurde. Durch die nachfolgende Elution mit einem NaCl-Gradienten und eine zweite Chromatographie über Einstrang-DNS-Zellulose konnte dann aber eine vollständige Trennung dieser beiden Proteine erreicht werden (Abb. 2).

Alle übrigen Proteine des Gehirnexttrakts schienen Einstrang-DNS nicht selektiv binden zu können oder aber ihre Bindung war so stark, dass sie den hier gewählten Bedingungen (Elution mit max. 2 M NaCl) widerstand.

Tabelle 1: ISOLIERUNG UND REINIGUNG DES 35 K PROTEINS AUS KALBSHIRNRINDE MITTELS DNS-ZELLULOSE-CHROMATOGRAPHIE

<u>Schritt</u>	<u>Volumen</u> (ml)	<u>Totalprotein</u> (mg)	<u>Ausbeute</u> (%)
Extraktion	930	36000	100
Säulenspeisung (gekoppelte DNS-Zellulose-Säulen)	2760	7513	20,58
Eluat der ersten Einstrang- DNS-Zellulose-Säule	24	16	0,044
Eluat der zweiten Einstrang- DNS-Zellulose-Säule	26	4	0,01

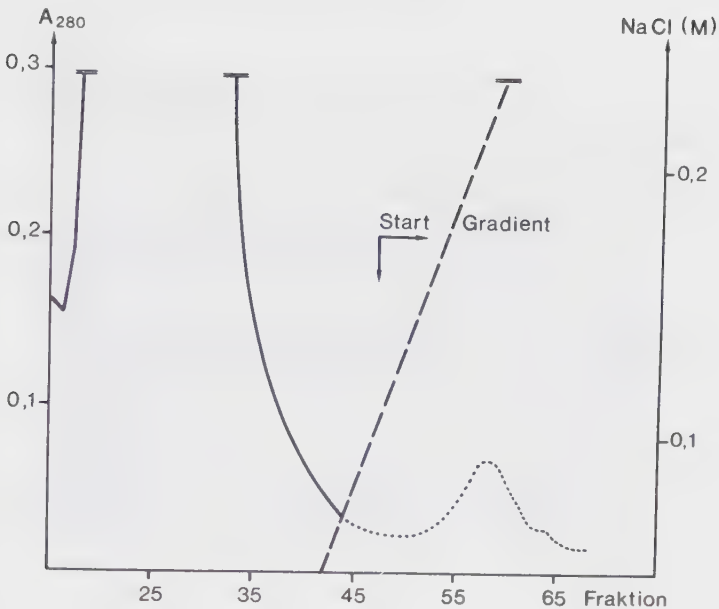


Abbildung 1 - Gradientenelution der ersten Einstrang-DNS-Zellulose-Säule. Die Säule wurde zuerst mit Natrium-Dextransulphat gewaschen und die Absorption bei 280 nm im Eluat bestimmt (—). Anschliessend wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten (---) eluiert und die Absorption (...) gemessen. Die proteinhaltigen Fraktionen des Gradienteneluats (...) wurden vereinigt und zur Beschickung der zweiten Einstrang-DNS-Zellulose-Säule verwendet.

5.2. AMINOSÄURENZUSAMMENSETZUNG

Das Protein zeigte einen stark basischen isoelektrischen Punkt, was den hohen Gehalt an basischen Aminosäuren (Lysin, Histidin und Arginin) widerspiegelt (Tab. 2). Die Ähnlichkeit der Zusammensetzungen des 35 K Proteins aus Kalbsgehirn und des 33 K

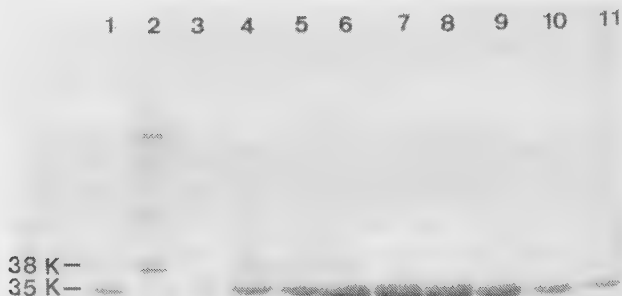


Abbildung 2 - Reinigung des 35 K Proteins mit Hilfe der zweiten Einstrang-DNS-Zellulose-Säule. Analyse der Proteinfraktionen durch PAGE auf einem 12% Platten-gel. Spur 1: Säulenspeisung, Spur 2: Durchbruch, Spuren 3 - 11: Verschiedene Fraktionen des Gradienteneluats. Ein Protein mit MG 38 000 konnte durch die Gradientenelution vom 35 K Protein abgetrennt werden. Färbung mit Coomassieblau.

Proteins aus Kalbsthymus war auffallend. Unterschiede betrafen vor allem den Gehalt an Threonin, Alanin, Glyzin und Methionin.

Aus dem Gehalt an Tyrosin und Tryptophan errechnete sich der Absorptionskoeffizient bei 280 nm ($A_{280}^{1\%}$) zu 11.6.

Tabelle 2: AMINOSÄURENZUSAMMENSETZUNG (ANGEGEBEN IN AMINOSÄURERESTEN PRO UNTEREINHEIT)

Aminosäure	35 K Protein aus Kalbsgehirn	33 K Protein aus Kalbsthymus *
Lys	23	25
His	10	8,3
Arg	11	13
Asx	25	30
Thr	19	13
Ser	20	20
Glx	30	27
Pro	13	11
Gly	32	25
Ala	28	20
Cys	n.b.	6
Val	28	28
Met	6	11
Ile	24	19
Leu	30	31
Tyr	6	7,4
Phe	9	8,2
Trp	6	11

* = Literaturwerte nach Herrick und Alberts (1976a)

n.b. = nicht bestimmt.

5.3. MOLEKULARGEWICHT

Die Bestimmung des Molekulargewichtes der Untereinheiten des Proteins anhand der relativen Mobilität auf SDS-PAGE-Plattengelen (12%) ergab einen Wert von 35 000 (35 K, Abb. 3). Eigene Bestimmungen des Molekulargewichtes des homologen Proteins aus

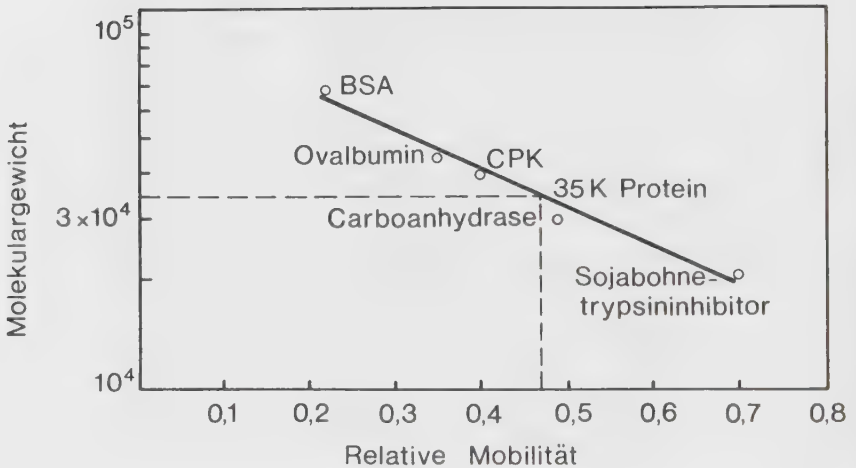


Abbildung 3 - Bestimmung des Molekulargewichtes der Untereinheiten anhand der relativen elektrophoretischen Beweglichkeit auf 12% Polyakrylamidgelen.

Kalbsthymus ergaben im Gegensatz zur Literatur (MG = 33 000, Herrick und Alberts 1976a) ebenfalls ein MG von 35 000, einen Unterschied, der jedoch nicht überwertet werden sollte, weil diese Bestimmungsmethode selbst vom Gelsystem und anderen Parametern abhängig ist. Jedenfalls wanderten beide Proteine, wenn gemischt, als eine Bande (Abb. 8).

Die Gelfiltration (Abb. 4) wurde zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes gewählt. Für das 35 K Protein wurde als Mittel von 5 Versuchen ein Wert von 125 000 gemessen. Das Protein liegt offenbar in nativem Zustand als Tetramer vor. Für das 33 K Pro-

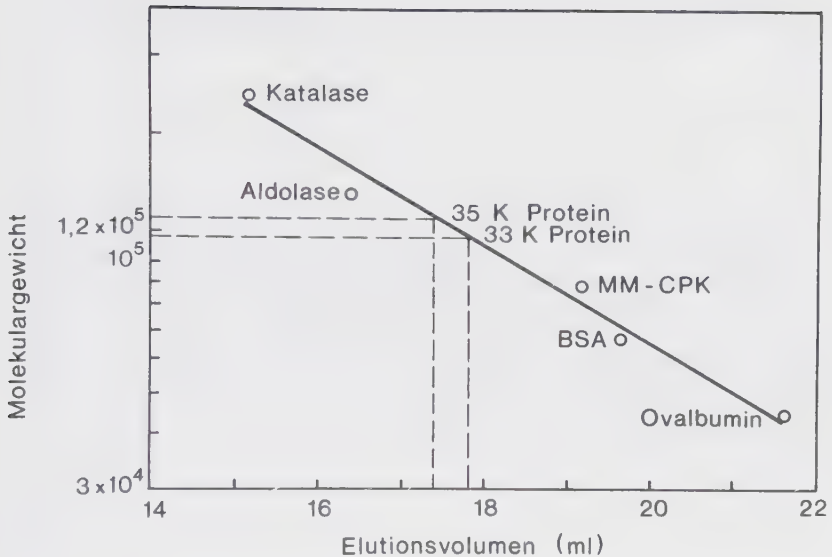


Abbildung 4 - Bestimmung des nativen Molekulargewichtes durch Sephadex-Gelchromatographie

tein wurde in ebensovielen Versuchen ein Wert von 115 000 ermittelt. Es wies in allen Experimenten ein etwas kleineres Molekulargewicht auf als das Protein aus Kalbshirnrinde.

Bonne et al. (1979) fanden in der Rattenleber ein Einstrang-DNS-bindendes Protein mit dem Molekulargewicht 25 000 unter denaturierenden Bedingungen. Bei niedriger Ionenstärke lag dieses ebenfalls als Tetramer vor.

Die tetramere Struktur des 35 K Proteins und seine Eigenschaft DNS zu binden, könnten als Hinweise für eine regulatorische Funktion ausgelegt werden, da alle bisher charakterisierten regulatorischen Proteine oligomere Struktur besitzen.

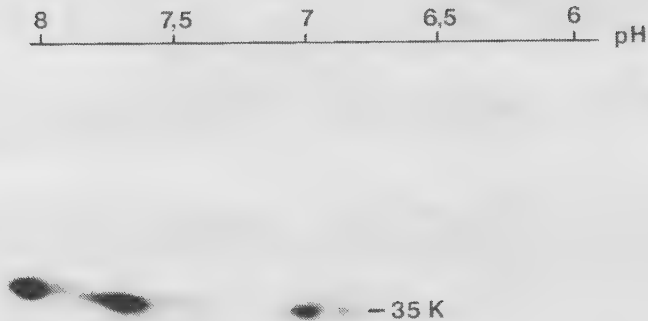
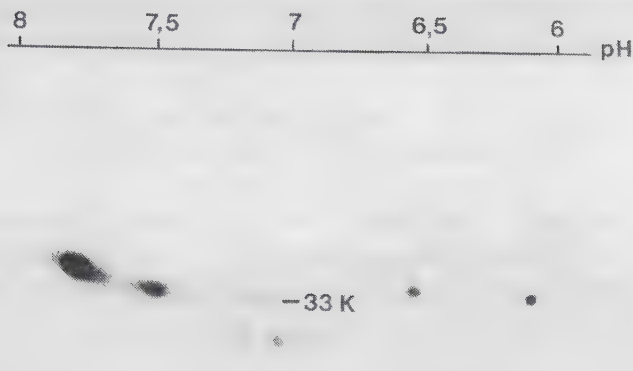


Abbildung 5 - 2-D-Elektrophorese (12% Polyakrylamid-Plattengel) des gereinigten, [^{14}C]methylierten 35 K Proteins (2,5 μg) aus Kalbshirnrinde. Der Nachweis erfolgte durch Fluorographie (Expositionsdauer 24 h).

5.4. GELELEKTROPHORETISCHES VERHALTEN

Das Verhalten des Proteins auf SDS-PAGE-Plattengelen wurde bereits in den Kapiteln 5.1. und 5.3. dargestellt. Benützt man zur Untersuchung die zweidimensionale Gelelektrophorese, erscheint das 35 K Protein zwar im Bezug auf sein MG an der erwarteten Stelle, jedoch scheinen Untereinheiten mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten vorzukommen (Abb. 5). Diese geben Anlass zu mindestens 4 Flecken zwischen pH 7 bis über 8.

8 7,5 7 6,5 6 pH



-33 K

Abbildung 6 - 2-D-Elektrophorese (12% Polyakrylamid-Plattengel) des gereinigten, [^{14}C]methylierten 33 K Proteins (2 μg) aus Kalbsthymus. Der Nachweis erfolgte durch Fluorographie (Expositionsdauer 4 Tage).

Bei dieser Mikroheterogenität handelt es sich sehr wahrscheinlich um eine posttranslationelle Modifikation der Proteinuntereinheiten. Diese ist bei ganz verschiedenen Nichthistonproteinen (und Histonen) beschrieben worden. Es kann sich um unterschiedliche Methylierung (Boffa et al. 1979), Azetylierung (Sterner et al. 1979) oder Phosphorylierung (Kanungo und Thakur 1979 und Gerner et al. 1981) handeln. Vor allem DNS-bindende Proteine sind bekannt dafür, dass sie phosphoryliert werden können.

Gerner et al. (1981) konnten zeigen, dass es eine von zyklischem Adenosin-Monophosphat abhängige, Zellzyklus-spezifische Phosphorylierung gibt. Herrick et al. (1976) isolierten aus Kalbsthymus ein Einstrang-DNS-bindendes Nihthistonprotein vom MG 24 000 (UP 1), das ebenfalls Mikroheterogenität aufwies, und dessen Untereinheiten je nach Phosphorylierungsgrad Einstrang-DNS stärker oder schwächer binden konnten. Je basischer der isoelektrische Punkt der Proteinsubspezies, desto enger war die Bindung mit DNS und desto grösser war auch die Stimulation von Kalbsthymus-DNS-Polymerase α .

Vergleicht man die 2-D Gele von 35 K Protein (Abb. 5) und 33 K Protein (Abb. 6), ist eine unterschiedliche Verteilung der Flecken sichtbar. Beide Muster waren für das jeweilige Protein reproduzierbar. Das 33 K Protein weist auf dem gezeigten Gel (Abb. 6) neben den 3 Hauptflecken einige Verunreinigungen durch andere, mitisolierte Proteine auf.

5.5. BEEINFLUSSUNG DES SCHMELZPUNKTES VON NATIVER DNS UND RENATURIERUNGSEIGENSCHAFTEN

Die Schmelzpunktbestimmungen mit Poly(dA-dT)•poly(dA-dT) oder nativer Kalbsthymus-DNS in heizbaren Küvetten zeigten wiederholt keine messbaren Verschiebungen der Schmelztemperatur in Anwesenheit des 35 K Proteins.

Um ausschliessen zu können, dass eine partielle Denaturierung der DNS schon bei Zimmertemperatur vor Versuchsaufzeichnung stattgefunden hatte, wurde die in 4.10. beschriebene Versuchsanordnung mit Zweikammer-Küvetten gewählt. Manche helixdestabilisierende Proteine beschleunigen nämlich den Uebergang der DNS in den einsträngigen Zustand so, dass er kurz (Sekunden bis Minuten) nach der Proteinzugabe schon beendet ist. Aber auch mit dieser Anordnung konnte eine Erniedrigung des Schmelzpunktes ausgeschlossen werden. Ebenfalls konnten keine Renaturierungseigenschaften festgestellt werden. Nach Herrick und Alberts

(1976b) hat auch das 33 K Protein aus Kalbsthymus keine messbare helixdestabilisierende Wirkung.

5.6. CHARAKTERISIERUNG DES ANTISERUMS

Tabelle 3 zeigt den Verlauf der Antikörpertiter während der Immunisierung. Beide Kaninchen entwickelten hohe Antikörperkonzentrationen.

Tabelle 3: ANTIKOERPERTITERVERLAUF WAEHREND DES
IMMUNISIERUNGSVORGANGES

Datum	Antikörpertiter	
	Kaninchen 1 (Zippe)	Kaninchen 2 (Bock)
20.11.1979	keine reagierenden Antikörper gefunden (Präimmunserum)	
10.12.1979	1 : 500	1 : 1 000
3. 1.1980	1 : 20 000	1 : 40 000
16. 1.1980	1 : 80 000	1 : 160 000

Die Gelddiffusion nach Ouchterlony zeigte bei beiden Seren eine einzige Präzipitationslinie gegen Kalbshirnextrakt und gereinigtes 35 K Protein. Die Fusion der beiden Linien bewies die immunologische Identität der Präzipitate. Keine Präzipitation erfolgte gegen Rattenhirnextrakt und Rattenleberextrakt.

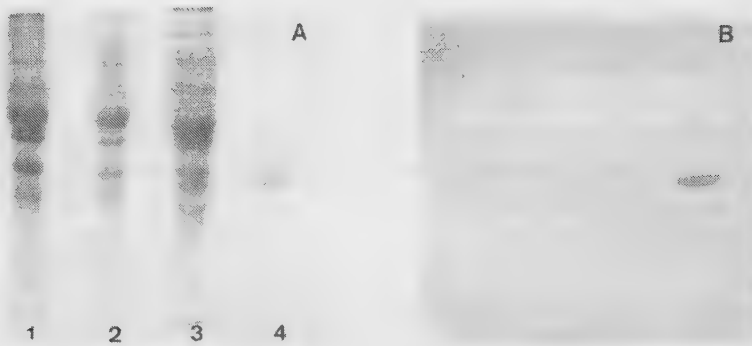


Abbildung 7 - SDS-Elektrophorese auf 12% Polyakrylamidgel (A) und dazugehöriges Immunreplikat mit Antikörpern gegen das 35 K Protein (B). Spur 1 : Gesamtextrakt aus Kalbshirn, Spur 2 : Gesamtextrakt aus Rattengehirn, Spur 3 : Gesamtextrakt aus Rattenleber, Spur 4 : teilweise gereinigte Proteinfraction, die neben dem 35 K Protein noch geringe Mengen des Proteins vom MG 38 000 enthält. Färbung mit Coomassieblau.

Abbildung 7 zeigt, dass die Antikörper nur gegen das 35 K Protein im Kalbshirnextrakt und in der teilweise gereinigten Fraktion reagieren. Keine Präzipitation erfolgte mit Proteinen des Rattengehirn- und des Rattenleberextrakts. Diese müssen also immunologisch verschieden sein (Spezies-Spezifität).

Andererseits zeigt das Antiserum beim direkten Vergleich des 35 K Proteins mit dem homologen 33 K Protein aus Kalbsthymus eine partielle Reaktion (Abb. 8). Die Gewebespezifität ist offenbar immunologisch wenig ausgeprägt. Wie aus Tab. 4 hervorgeht, sind

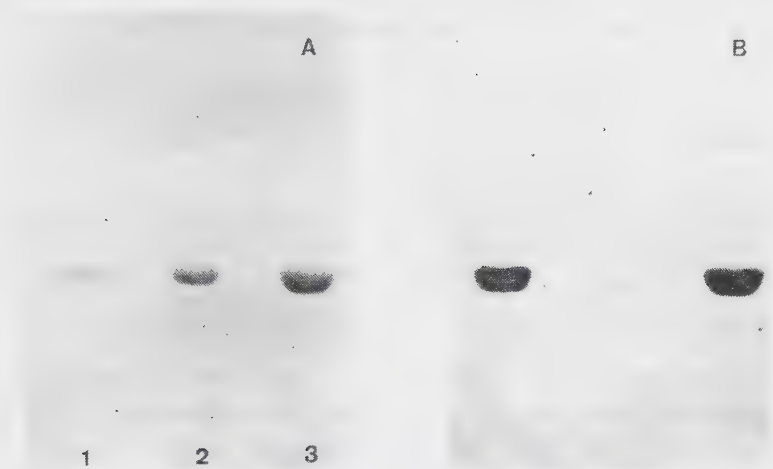


Abbildung 8 - SDS-Elektrophorese auf 12% Polyakrylamidgel (A) und dazugehöriges Immunoreplikat mit Antikörpern gegen das 35 K Protein (B). Spur 1 : 35 K Protein aus Kalbsgehirn, Spur 2 : 33 K Protein aus Kalbsthymus, Spur 3 : Gemisch beider Proteine. Färbung mit Coomassieblau.

sich die beiden Proteine auch in ihren biochemischen Eigenschaften sehr ähnlich.

Tabelle 4 fasst die biochemischen und immunologischen Eigenschaften des Proteins zusammen und stellt sie denjenigen des 33 K Proteins aus Kalbsthymus gegenüber.

Tabelle 4: EIGENSCHAFTEN DES 35 K PROTEINS AUS KALBSHIRNRINDE
UND DES 33 K PROTEINS AUS KALBSTHYMUS

	<u>35 K Protein</u>	<u>33 K Protein</u>
Isolation	identisch	
Mittlere NaCl-Konzentration zur Elution von der Einstrang-DNS-Zellulose	0,23 - 0,26 M NaCl	0,15 M NaCl
Molekulargewicht einer Untereinheit	35 000	33 000 bzw. 35 000*
Molekulargewicht nativ (auf Sephadex bestimmt)	125 000	115 000*
Aminosäurezusammensetzung	ähnlich (Tab. 2)	
Bindungseigenschaft	Einstrang-DNS	
DNS-Destabilisierungs- und Renaturierungseigenschaften	nicht messbar	nicht messbar
Isoelektrischer Punkt	basisch (über pH 8)	
Elektrophoretische Eigenschaften auf 2-D-Gelen	Mikroheterogenität (pH 7,5 - 8)	
Immunologisches Verhalten	gute Antigenität, partielle Reaktion der gegen das 35 K Protein erzeugten Antikörper mit dem 33 K Protein	

* = eigene Untersuchungen mit dem 33 K Protein, die anderen Werte sind Literaturangaben aus Herrick und Alberts, 1976a und 1976b.

5.7. ISOLIERUNG UND REINIGUNG DES PROTEINS MITTELS IMMUNOSORBENS

Mit den spezifischen Antikörpern war es unter anderem möglich, die Isolierung des 35 K Proteins zu vereinfachen und die Ausbeute zu verbessern. Ausserdem konnte die Verwendung von Natrium-Dextranulphat umgangen werden. Diese Verbindung ist nämlich als DNS-Polymerasehemmer bekannt. Da später der Einfluss des 35 K Proteins auf DNS-Polymerasen untersucht werden soll, musste auf eine Verwendung von Natrium-Dextranulphat verzich-

tet werden. Aus denselben Gründen war auch die Verwendung von Detergentien für die Entfernung unspezifisch an das Immunosorbens gebundener Proteine ausgeschlossen. Deshalb war damit zu rechnen, dass einige Proteine unspezifisch am Immunosorbens haften würden. In der Tat blieb ein Protein mit dem Molekulargewicht 45 000 in fast gleichen Quantitäten wie das 35 K Protein auf der Säule hängen und wurde gemeinsam mit diesem eluiert. Es konnte dann aber durch die nachfolgende Chromatographie auf Einstrang-DNS-Zellulose abgetrennt werden (Abb. 9).

Tabelle 5: ISOLIERUNG UND REINIGUNG DES 35 K PROTEINS AUS KALBSHIRNRINDE DURCH IMMUNADSORPTION UND NACHFOLGENDE CHROMATOGRAPHIE AUF EINSTRANG-DNS-ZELLULOSE

<u>Schritt</u>	<u>Volumen</u> (ml)	<u>Totalprotein</u> (mg)	<u>Ausbeute</u> (%)
Extraktion	520	20 000	100
Eluat des Immunosorbens	22	20	0,1
Eluat der Einstrang-DNS-Zellulose-Säule	16,8	5	0,025

Die Effizienz der Immunadsorption geht aus dem Vergleich von Tab. 5 mit Tab. 1 hervor. Man bedenke, dass für die Isolierung mittels Immunosorbens die Hirnrinde von nur 2 Kalbsgehirnen verwendet wurde. Im Vergleich dazu wurden bei der Reinigung durch Affinitätschromatographie mit Säulen aus Nativ-DNS-Zellulose und Einstrang-DNS-Zellulose 4 Gehirne verwendet. Die Ausbeute der Immunosorbens-Methode ist also 5 mal grösser und der Zeitaufwand etwa halb so gross.

Um zu prüfen, ob das mit Hilfe des Immunosorbens isolierte 35 K Protein unter den unter 4.15. erwähnten, drastischen Elutionsbedingungen überhaupt noch im Nativzustand vorlag, wurde sein Verhalten bei der Passage über eine Einstrang-DNS-Zellulose-

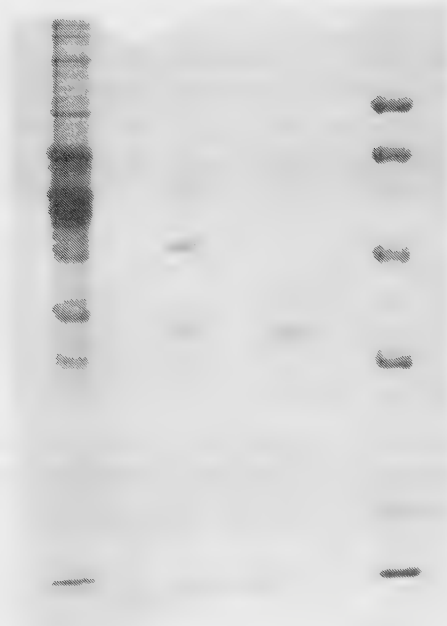


Abbildung 9 - Prüfung der Reinheit des mittels Immunosorbens isolierten 35 K Proteins aus Kalbshirnrinde. SDS-Elektrophorese auf 12% Polyakrylamidgel. Aufgetragene Proteine von links nach rechts: Rohextrakt aus Kalbshirnrinde, Eluat des Immunosorbens, Eluat der Einstrang-DNS-Zellulose-Säule, Markerproteingemisch (siehe Methoden). Färbung mit Coomassieblau.

Säule geprüft. Dabei zeigte sich, dass die Eigenschaft, Einstrang-DNS zu binden, erhalten blieb. Bei einer Probe des gereinigten Proteins wurde zusätzlich durch Gelchromatographie (4.8.) das Molekulargewicht geprüft. Auch dieses stimmte mit demjenigen von Proteinproben aus früheren Isolationen überein.

6. Schlussfolgerungen

Die Eigenschaften des gereinigten 35 K Proteins aus Kalbshirnrinde sind denjenigen eines homologen Proteins aus Kalbsthymus sehr ähnlich, aber nicht mit ihnen identisch (Herrick und Alberts 1976a und 1976b). Dies manifestiert sich auch, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, darin, dass Antikörper, die gegen das 35 K Protein erzeugt wurden, auch mit dem 33 K Protein reagieren. Es liegen offenbar geringgradige gewebespezifische Strukturunterschiede vor. Andererseits reagieren dieselben Antikörper nicht gegen ein homologes Protein im Rattenhirnextrakt, was für eine immunologisch absolute Spezifität spricht.

Die Tatsache, dass ein homologes Protein vom Molekulargewicht 35 000 in Cortexneuronen der Ratte zeitlich exakt mit dem Verlust der Mitosefähigkeit dieser Zellen auftritt (Heizmann et al. 1980b), deutet darauf hin, dass dieses Protein funktionell vielleicht an diesem Vorgang beteiligt ist. Da dieses Protein zwar an DNS bindet, offenbar aber keine direkte Wirkung auf die Stabilität der DNS-Doppelhelix ausübt (zumindest nicht das Protein aus Kalbshirnrinde), wäre es interessant zu untersuchen, ob eine Unterdrückung der Zellproliferation möglicherweise über eine Beeinflussung der DNS-Polymerasen zustande kommt. Vorversuche von Hübscher (1981) haben gezeigt, dass das 35 K Protein die DNS-Polymerase α aus Kalbsthymus hemmt, nicht aber die β - oder γ -Polymerase derselben Herkunft. Ebenfalls nicht gehemmt wurden die replikativen Polymerasen aus der Fliege *Drosophila melanogaster* und dem Pilz *Ustilago maydis*. Prokaryontische DNS-Polymerasen von *Escherichia coli* blieben unbeeinflusst. Dies könnte als Hinweis für eine ganz spezifische Rolle des 35 K Proteins bei der DNS-Replikation von Säugetierzellen aufgefasst werden. Weitere Untersuchungen werden zeigen müssen, ob sich diese Hypothese bewahrheitet. Vorläufige Resultate haben jedoch bereits den Hinweis erbracht, dass homologe Proteine auch in

anderen teilungsunfähigen Zellen vorkommen, z.B. in Körnerzell-neuronen des Kleinhirns, Gliazellen der Hirnrinde und Leber-zellen (Heizmann et al. 1980a und eigene vorläufige Resultate).

Direkte Hinweise auf regulatorische Funktionen von Nichthiston-proteinen wurden bisher überwiegend in Bezug auf die Genexpres-sion und weniger auf die Replikation erbracht. So zeigte eine Arbeit von Craddock und Henderson (1980) eine verminderte Syn-these bestimmter Nichthistonproteine in der regenerierenden Rattenleber. Versuche von Lincoln und Stott (1980) ergaben eben-falls veränderte Nichthistonproteinmuster in Subklonen einer Plasmazytom-Zellkultur, je nachdem, ob die Zellen ganze IgA, nur leichte Ketten oder gar keine Immunproteine produzierten. Weitere Hinweise auf regulatorische Funktionen von Nichthiston-proteinen finden sich bei der terminalen Differenzierung von Erythrozyten des Mäusefetus. Die Heterochromatinzunahme ist ver-bunden einerseits mit dem Verlust verschiedener Nichthistone, andererseits mit dem Auftreten eines 35 000 Dalton Proteins (Lunadei et al. 1979).

Sollten weitere Experimente in der Tat ergeben, dass das hier isolierte 35 K Protein für die Unterdrückung der Zellteilung mitverantwortlich ist, so wäre es das erste bekanntwerdende Protein, dem in Eukaryonten eine solche Funktion zugeordnet werden könnte.

7. Zusammenfassung

Aus Kalbshirnrinde wurde ein Einstrang-DNS-bindendes Protein isoliert, das aufgrund des Molekulargewichtes seiner Untereinheiten als 35 K Protein bezeichnet wurde. In nativer Form liegt das Protein als Tetramer vor mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 125 000 (bestimmt durch Gelfiltration). Das Molekulargewicht der 4 Untereinheiten beträgt 35 000 (bestimmt durch SDS-Gelelektrophorese). Das Protein bindet an Einstrang-DNS, nicht aber an Doppelstrang-DNS. Es besitzt weder helix-stabilisierende noch destabilisierende Eigenschaften. Sein isoelektrischer Punkt liegt um pH 8, was mit dem hohen Gehalt an basischen Aminosäuren zusammenhängt. Bei zweidimensionaler Gelelektrophorese zeigt sich eine Mikroheterogenität bezüglich Ladung im Bereich von pH 7 bis 8, die vermutlich unterschiedliche posttranslationelle Modifikationen widerspiegelt. Die genannten biochemischen Eigenschaften sind sehr ähnlich denjenigen eines 33 K Proteins aus Kalbsthymus. Homologie ergibt sich auch aus der Beobachtung, dass Antikörper gegen das 35 K Protein teilweise auch mit dem 33 K Protein reagieren. Hingegen konnte keine immunologische Kreuzreaktion gefunden werden mit einem homologen Protein aus dem Rattengehirn. Diese Resultate lassen auf eine relativ geringe Gewebespezifität aber hohe Spezifität des 35 K Proteins schließen. Vorläufige Untersuchungen lassen vermuten, dass das 35 K Protein an der Kontrolle der Teilungsfähigkeit verschiedener Säugetierzellen beteiligt sein könnte.

Summary

A single-strand DNA binding protein was isolated from calf brain cortex, which, on the basis of its subunit molecular weight, was designated 35 K protein. In its native form the protein exists as a tetramer of apparent molecular weight 125 000 as determined by gel filtration. Its subunit molecular weight is 35 000 by SDS gel elektrophoresis. The protein binds to single-stranded but not to double-stranded DNA. It does neither stabilize nor destabilize double helical DNA. Its isoelectric point is approximately 8 in agreement with its high content of basic amino acids. Upon two-dimensional gel electrophoresis it displays charge microheterogeneity, probably as a result of variable posttranslational modifications. The above biochemical characteristics are very similar to those of a 33 K protein from calf thymus. Homology is also apparent from the observation that antibodies raised against the 35 K protein also partially react with the 33 K protein. On the other hand, no immunological cross-reactivity was found with a homologous protein from rat brain. This argues for relatively weak tissue specificity but high species specificity of the 35 K protein. Preliminary data raise the intriguing possibility that the 35 K protein may be involved in the control of cell proliferation in various mammalian tissues.

8. Literaturverzeichnis*

- Alberts, B., Frey, L. and Delius, H. (1972)
Isolation and characterisation of gene 5 protein of filamentous bacterial viruses
J Mol Biol, 68, 139-152
- Alberts, B. and Herrick, G. (1971)
DNA cellulose chromatography
Methods Enzymol, 21 D, 198-217
- Alfageme, C.R., Rudkin, G.T. and Cohen, L.H. (1976)
Locations of chromosomal proteins in polytene chromosomes
Proc Nat Acad Sci USA, 73, 2038-2042
- Andrews, P. (1964)
Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex gel-filtration
Biochem J, 91, 222-233
- Andrews, P. (1965)
The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range
Biochem J, 96, 595-606
- Boffa, L.C., Sterner, R., Vidali, G. and Allfrey, V.G. (1979)
Post-synthetic modifications of nuclear proteins. High-mobility-group proteins are methylated
Biochem Biophys Res Commun, 89, 1322-1327
- Bonne, C., Duguet, M. and de Recondo, A.M. (1979)
Rat liver DNA binding proteins: Physiological variations
FEBS Lett, 106, 292-296
- Bonner, J. (1979)
In : Chromatin structure and function (Nicolini, C.A., ed.)
Part A, pp 3-25, Plenum, New York
- Bonner, W.M. and Laskey, R.A. (1974)
A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamid gels
Eur J Biochem, 46, 83-88
- Bregnard, A., Knüsel, A. and Kuenzle, C.C. (1975)
Are all the neuronal nuclei polyploid ?
Histochemistry, 43, 59-61

* Abkürzungen der Zeitschriftennamen nach World Medical Periodicals, World Medical Association, 1961

- Bregnard, A., Kuenzle, C.C. and Ruch, F. (1977)
Cytophotometric and autoradiographic evidence for postnatal DNA synthesis in neurons of the rat cerebral cortex
Exp Cell Res, 107, 151-157
- Bregnard, A., Ruch, F., Lutz, H. and Kuenzle, C.C. (1979)
Histones and DNA increase synchronously in neurons during early postnatal development of the rat forebrain cortex
Histochemistry, 61, 271-279
- Brown, I.R. (1978)
Postnatal appearance of a short DNA repeat length in neurons of the cerebral cortex
Biochem Biophys Res Commun, 84, 285-292
- Bustin, M. and Neihart, N.K. (1979)
Antibodies against chromosomal HMG proteins stain the cytoplasm of mammalian cells
Cell, 16, 181-189
- Catino, J.J., Busch, H., Daskal, Y. and Yeoman, L.C. (1979)
Subcellular localization of DNA-binding protein BA by immunofluorescence microscopy
J Cell Biol, 83, 462-467
- Catt, K. and Tregear, G.W. (1967)
Solid phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes
Science, 158, 1570-1571
- Coleman, J.E. and Oakley, J.L. (1980)
Physical chemical studies of the structure and function of DNA binding (helix-destabilizing) proteins
CRC Crit Rev Biochem, 7, 247-289
- Craddock, V.M. and Henderson, A.R. (1980)
The effect of dimethylnitrosamine on the synthesis of high-mobility-group non histone proteins in regenerating rat liver
Carcinogenesis, 1, 445-450
- Crepin, M. and Dastugue, B. (1979)
Regulation of transcription by DNA-bound non-histone nuclear proteins
Eur J Biochem, 99, 499-505
- Dastugue, B. and Crepin, M. (1979)
Interaction of non-histone proteins with DNA and chromatin from drosophila and mouse cells
Eur J Biochem, 99, 491-498
- Duguet, M. and de Recondo, A.M. (1978)
A deoxyribonucleic acid unwinding protein isolated from regenerating rat liver
J Biol Chem, 253, 1660-1666

- Elgin, S.C.R. and Weintraub, H. (1975)
Chromosomal proteins and chromatin structure
Ann Rev Biochem, 44, 725-774
- Engvall, E., Jonsson, K. and Perlmann, P. (1971)
Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of
protein antigen, immunoglobulin G by means of enzyme-labelled
antigen and antibody-coated tubes
Biochim Biophys Acta, 251, 427-434
- Engvall, E. and Perlmann, P. (1971)
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay
of immunoglobulin G
Immunochemistry, 8, 871-874
- Engvall, E. and Perlmann, P. (1972)
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). III. Quantitation of
specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in
antigen-coated tubes
J Immunol, 109, 129-135
- Ermini, M. and Kuenzle, C.C. (1978)
The chromatin repeat length of cortical neurons shortens during
early postnatal development
FEBS Lett, 90, 167-172
- Falaschi, A., Cobianchi, F. and Riva, S. (1980)
DNA-binding proteins and DNA-unwinding enzymes in eukaryotes
Trends in Biochem Sci, 5, 154-157
- Felsenfeld, G. (1978)
Chromatin
Nature, 271, 115-122
- Fey, H. (1978)
Persönliche Mitteilung
- Gerner, E.W., Costa, M., Holmes, D.K. and Magun, B.E. (1981)
Phosphorylation of nuclear and DNA-binding proteins in prolifera-
ting and quiescent mammalian cells
Biochem J, 194, 193-207
- Goodwin, G.H., Sanders, C. and Johns, E.W. (1973)
A new group of chromatin-associated proteins with a high con-
tent of acidic and basic amino acids
Eur J Biochem, 38, 14-19
- Goodwin, G.H., Shooter, K.V. and Johns, E.W. (1975)
Interaction of a non-histone chromatin protein (high-mobility-
group protein 2) with DNA
Eur J Biochem, 54, 427-433

- Goodwin, G.H., Woodhead, L. and Johns, E.W. (1977)
The presence of high-mobility-group non-histone chromatin proteins in isolated nucleosomes
FEBS Lett, 73, 85-88
- Goodwin, G.H., Walker, J.M. and Johns, E.W. (1978)
In : The cell nucleus, IV. (Busch, H., ed.), pp 181-219
Academic Press, New York
- Goodwin, G.H., Mathew, C.G.P., Wright, C.A., Venkow, C.D. and Johns, E.W. (1979)
Analysis of the high-mobility-group proteins associated with salt-soluble nucleosomes
Nucl Acids Res, 7, 1815-1833
- Goodwin, G.H., Brown, E., Walker, J.M. and Johns, E.W. (1980)
The isolation of three new high-mobility-group nuclear proteins
Biochim Biophys Acta, 623.2, 329-338
- Gordon, J.S., Rosenfeld, B.I., Kaufman, R. and Williams, D.L. (1980)
Evidence for a quantitative tissue specific distribution of the high mobility group chromosomal proteins
Biochemistry, 19, 4395-4402
- Hamana, K. and Iwai, K. (1979)
High mobility group nonhistone chromosomal proteins also exist in tetrahymena
J Biochem, 86, 789-794
- Hand, R. (1978)
Eucaryotic DNA : Organization of the genome for replication
Cell, 15, 317-325
- Heizmann, C.W., Arnold, E.M. and Kuenzle, C.C. (1980a)
Fluctuations of non-histone chromosomal proteins in differentiating brain cortex and cerebellar neurons
J Biol Chem, 255, 11504-11511
- Heizmann, C.W., Winkler, G., Arnold, E.M. and Kuenzle, C.C. (1980b)
Changing patterns of non-histone chromosomal proteins during differentiation of brain cortex neurons. Isolation of a post-natally accumulating single-stranded DNA binding protein of M_r 35 000
Eur J Cell Biol, 22, 92
- Herrick, G. and Alberts, B. (1976a)
Purification and physiological characterization of nucleic acid helix-unwinding proteins from calf thymus
J Biol Chem, 251, 2124-2132

- Herrick, G. and Alberts, B. (1976b)
Nucleic acid helix-coil transitions mediated by helix-unwinding proteins from calf thymus
J Biol Chem, 251, 2133-2141
- Herrick, G., Delius, H. and Alberts, B. (1976)
Single-stranded DNA structure and DNA polymerase activity in the presence of nucleic acid helix-unwinding proteins from calf thymus
J Biol Chem, 251, 2142-2146
- Hübscher, U. (1981)
Persönliche Mitteilung
- Isackson, P.J., Fishback, J.L., Bidney, D.L. and Reck, G.R. (1979)
Preferential affinity of high molecular weight high mobility group non histone chromatin proteins for single-stranded DNA
J Biol Chem, 254, 5569-5572
- Jacobson, M. (1978)
In : Developmental neurobiology
Plenum, New York
- Javaherian, K., Sadeghi, M. and Liu, L.F. (1979)
Nonhistone proteins HMG 1 and HMG 2 unwind DNA double helix
Nucleic Acids Res, 6, 3569-3580
- Jentoft, N. and Dearborn, D.G. (1979)
Labeling of proteins by reductive methylation using sodium cyanoborohydride
J Biol Chem, 254, 4359-4365
- Kanungo, M.S. and Thakur, M.K. (1979)
Phosphorylation and acetylation of nonhistone chromosomal proteins of the brain of rats of various ages and their modulation by calcium and estradiol
Biochem Biophys Res Commun, 86, 14-19
- Kornberg, R.D. (1977)
Structure of chromatin
Ann Rev Biochem, 46, 931-954
- Kornberg, R.D. and Klug, A. (1981)
The nucleosome
Sci Am, 244, 48-60
- Kuenzle, C.C., Bregnard, A., Hübscher, U. and Ruch, F. (1978)
Extra DNA in forebrain cortical neurons
Exp Cell Res, 113, 151-160

- Laemmli, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4
Nature, 227, 680-685
- Laskey, R.A. and Mills, A.D. (1975)
Quantitative Film Detection of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography
Eur J Biochem, 56, 335-341
- Levy, B., Wong, N.C.W. and Dixon, G.H. (1977)
Selective association of the trout-specific H 6 protein with chromatin regions susceptible to DNase I and DNase II : Possible location of HMG-T in the spacer region between core nucleosomes
Proc Natl Acad Sci USA, 74, 2810-2814
- Lincoln, J.C. and Stott, D.I. (1980)
Analysis of plasmacytoma nonhistone chromatin proteins
Cell Biol Int Rep 4, 805
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951)
Protein measurement with the folin phenol reagent
J Biol Chem, 193, 265-275
- Lunadei, M., Del Marco, A., Fantoni, A., Farace, M.G. and Ullu, E. (1979)
Terminal Erythroid Differentiation - Progressive heterochromatinization is accompanied by the selective removal of non-histone chromatin proteins
Atti Ass Gen Ital, 24, 190-192
- Mardian, J.K.W., Paton, A.E., Bunick, G.J. and Olins, D.E. (1980)
Nucleosome cores have two specific binding sites for nonhistone chromosomal proteins HMG 14 and HMG 17
Science, 209, 1534-1536
- Marushige, K. and Dixon, G.H. (1971)
Transformation of trout testis chromatin
J Biol Chem, 246, 5799-5805
- Mather, J. and Hotta, Y. (1977)
A phosphorylatable DNA binding protein associated with a lipo-protein fraction from rat spermatocyte nuclei
Exp Cell Res, 109, 181-189
- Meyer, R.R., Glassberg, J. and Kornberg, A. (1979)
An escherichia coli mutant defective in single-strand binding protein is defective in DNA replication
Proc Nat Acad Sci USA, 76, 1702-1705

- Moranelli, F. and Lieberman, M.W. (1980)
Recognition of chemical carcinogen-modified DNA by a DNA-binding protein
Proc Nat Acad Sci USA, 77, 3201-3205
- Neubort, S., Liebeskind, D., Mendez, F. and Bases, R. (1979)
Tightly bound chromatin proteins with rapid metabolic turnover suppress antinucleoside immunoreactivity in HeLa cell nuclei
Exp Cell Res, 123, 55-62
- O'Farrell, P.H. (1975)
High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins
J Biol Chem, 250, 4007-4021
- Olins, A.L. and Olins, D.E. (1974)
Spheroid chromatin units (γ bodies)
Science, 183, 330-332
- Ouchterlony, O. (1967)
In : Handbook of experimental immunology (Weir, D.M., ed.)
Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Peters, E.H., Levy-Wilson, B. and Dixon, G.H. (1979)
Evidence for the location of high-mobility-group protein T in the internucleosomal linker regions of trout testis chromatin
J Biol Chem, 254, 3358-3361
- Rabbani, A., Goodwin, G.H. and Johns, E.W. (1978)
Studies on the tissue specificity of the high-mobility-group non-histone chromosomal proteins from calf
Biochem J, 173, 497-505
- Rabbani, A., Goodwin, G.H., Walker, J.M., Brown, E. and Johns, E.W. (1980)
Trout liver high-mobility-group non-histone chromosomal proteins
FEBS Lett, 109, 294-298
- Reinhard, P. and Müller, B. (1980)
Evidence for the involvement of single-strand DNA binding proteins in mammalian DNA replication
FEBS Lett, 113, 61-64
- Riva, S., Clivio, A., Valentini, O. and Cobianchi, F. (1980)
DNA-binding proteins from calf thymus with an enhanced ability to stimulate DNA polymerase α in vitro
Biochem Biophys Res Commun, 96, 1053-1062
- Romani, M., Rodman, T.C., Vidali, G. and Bustin, M. (1979)
Serological analysis of species specificity in the high-mobility-group chromosomal proteins
J Biol Chem, 254, 2918-2922

- Saunders, G.L. and Bartlett, M.L. (1977)
Double antibody solid phase enzyme immuno assay for the detection of staphylococcal enterotoxin A
Appl Env Microbiol, 34, 518-522
- Seyedin, S.M. and Kistler, W.S. (1979)
Levels of chromosomal protein high-mobility-group 2 parallel the proliferative activity of testis, skeletal muscle and other organs
J Biol Chem, 254, 11264-11271
- Shooter, K.V., Goodwin, G.H. and Johns, E.W. (1974)
Interactions of a purified non-histone chromosomal protein with DNA and histone
Eur J Biochem, 47, 263-270
- Showe, M.K., Isobe, E. and Onorato, L. (1976)
Bacteriophage T 4 prehead proteinase II. It's cleavage from the product of gene 21 and regulation in phage-infected cells
J Mol Biol, 107, 55-69
- Sterner, R., Vidali, G. and Allfrey, V.G. (1979)
Studies of acetylation and deacetylation in high-mobility-group proteins
J Biol Chem, 254, 11577-11583
- Studer, M., Kuenzle, C.C. and Ruch, F. (1981)
Persönliche Mitteilung
- Teng, C.S., Andrews, G.K. and Teng, C.T. (1979)
Studies on the high-mobility-group non-histone proteins from hen oviduct
Biochem J, 181, 585-591
- Thoma, F., Koller, T. and Klug, A. (1979)
Involvement of histone H 1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin
J Cell Biol, 83, 403-427
- Vidali, G., Boffa, L.C. and Allfrey, V.G. (1977)
Selective release of chromosomal proteins during limited DNase 1 digestion of avian erythrocyte chromatin
Cell, 12, 409-415
- Walker, J.M., Goodwin, G.H. and Johns, E.W. (1976)
The similarity of two non-histone chromosomal proteins
Eur J Biochem, 62, 461-469
- Walker, J.M., Brown, E., Goodwin, G.H., Stearn, C. and Johns, E.W. (1980)
Studies on the structures of some HMG-like non-histone chromosomal proteins from trout and chicken tissues. Comparison with calf thymus proteins HMG 14 and 17
FEBS Lett, 113, 253-257

Walker, J.M. and Johns, E.W. (1980)

The isolation, characterization and partial sequences of the chicken erythrocyte non-histone chromosomal proteins HMG 14 and HMG 17

Biochem J, 185, 383-386

Watson, D.C., Peters, E.H. and Dixon, G.H. (1977)

The purification, characterization and partial sequence determination of a trout testis non-histone protein, HMG-T

Eur J Biochem, 74, 53-60

Weideli, H., Brack, C. and Gehring, W.J. (1980)

Characterization of drosophila DNA-binding protein DB-2 : Demonstration of its sequence-specific interaction with DNA

Proc Nat Acad Sci USA, 77, 3773-3777

Weisbrod, S., Groudine, M. and Weintraub, H. (1980)

Interaction of HMG 14 and 17 with actively transcribed genes

Cell, 19, 289-301

Wigle, D.T. and Dixon, G.H. (1971)

A new histone from trout testis

J Biol Chem, 246, 5636-5644

9. Dankesadressen

Folgenden Damen und Herren bin ich zu grossem Dank verpflichtet für ihre Mitarbeit :

Dr. C.W. Heizmann für die Unterstützung während der experimentellen Arbeit und die Korrektur des Manuskriptes

Prof. Dr. C.C. Kuenzle für die Ueberwachung der Arbeit und das Referat

Prof. Dr. E. Jenny für das Korreferat

Frau J.M. Burger für die Niederschrift des Manuskriptes

Frau A. Hug für die photographische Gestaltung

Frau S. Pletscher für die graphischen Darstellungen.

Die Arbeit wurde finanziell unterstützt durch die Fritz Hoffmann-La Roche Stiftung (Kredit Nr. 153) und den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Kredit Nr. 3.105-0.77 und 3.604-0.80).

10. Lebenslauf

Winkler Gian-Christian, geboren am 2. November 1951 in Zürich,
Bürger von Zürich und Basel, verheiratet, wohnhaft Rotbuchstr. 40,
8037 Zürich.

1958 - 1964	Primarschule in Zürich, Leimbach ZH und Hirzel ZH
1964 - 1973	Kantonsschulen in Winterthur und Trogen AR
1973	Matura Typus B
1973 - 1978	Studium der Tiermedizin an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich
1978	Eidgenössisches Staatsexamen als Tierarzt
1978 - 1980	Assistent und Doktorand am Institut für Pharmakologie und Biochemie der vet. med. Fakultät der Universität Zürich (Prof. Dr. med. et phil. II C.C. Kuenzle)
1980 - 1981	Besuch des 13. Postgraduate-Kurses für experimentelle Medizin und Biologie in Zürich
seit Mai 1981	Assistent am Institut für Pathologie der med. Fakultät der Universität Zürich (Prof. Dr. J.R. Rüttner).

